

Emoglobina e mioglobina

Trasporto e deposito di ossigeno

- Come si muove l'ossigeno? È veicolato? Come è costituito il suo sistema di trasporto? Come viene trasportato l'ossigeno?

L'ossigeno è poco solubile alla nostra temperatura corporea (37°C) -> solitamente è più solubile a temperature più elevate.

Emoglobina: proteina che garantisce il trasporto dell'ossigeno.

In un uomo medio di 80 Kg abbiamo circa 17 g/dL di emoglobina -> quantitativamente abbastanza elevata: può essere facilmente isolata.

Deve legare l'ossigeno in maniere efficiente a livello dei polmoni, ma deve anche essere in grado di rilasciare l'ossigeno ai tessuti periferici.

L'ossigeno non si lega alla catena aa della proteina -> questo garantisce il corretto stato di attivazione dell'ossigeno.

Mioglobina: proteina che funge da deposito di ossigeno.

Contiene circa **153 aa**.

Notiamo che l'emoglobina ha 4 subunità -> la mioglobina molto simile alle singole strutture che compongono l'intera emoglobina.

Catene globiniche: componente proteica dell'emoglobina e della mioglobina, formata da **4 catene di aminoacidi**.

Mioglobina costituita da **1** sola catena **globinica**.

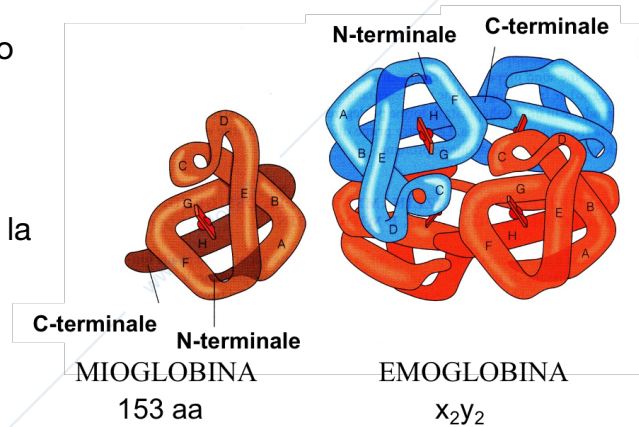
Catene globiniche presenti in diverse varianti dell'emoglobina

α	141 aa
β	146 aa
γ	147 aa
δ	147 aa
ϵ	147 aa

L'**emoglobina** è costituita da 4 subunità ciascuna contenente una catena globinica (in totale l'emoglobina contiene **4 catene globiniche**).

Possiamo generalizzarne la struttura dicendo che è composta da X_2Y_2 (ovvero 2 coppie di subunità).

Catene globiniche: diverse varianti per l'emoglobina (numero differente di aminoacidi).



A seconda di quali catena globiniche, sono presenti avremo delle varianti fisiologiche dell'emoglobina.

Emoglobina A (HbA) -> $\alpha_2\beta_2$ -> emoglobina adulta

Emoglobina E (HbE) -> $\alpha_2\varepsilon_2$ -> emoglobina embrionale

Emoglobina F (HbF) -> $\alpha_2\gamma_2$ -> emoglobina fetale

Differenza catene δ , β e γ -> β è caratteristica dell'emoglobina adulta, γ di quella fetale e δ è la catena globinica che si conserva ed è presente in tutte le Hb!

varianti fisiologiche dell'emoglobina

HbA	$\alpha_2\beta_2$
HbA ₂	$\alpha_2\delta_2$
HbF	$\alpha_2\gamma_2$
HbE	$\alpha_2\varepsilon_2$

Elementi comuni a tutte le catene globiniche (sia dell'Hb che di Mb):

- ciascuna catena globinica ha 8 segmenti ad alfa-elica (denominati con lettere dalla A alla H)
- ottimizzazione interazioni idrofobiche
- presenza di una cavità di inserimento del gruppo eme -> permette il legame con O₂
- cavità idrofobica dove si inserisce il gruppo eme

Importante:

His F8 (o *prossimale*): uno degli aa presente e conservato in tutte le catene globiniche (sia Hb sia Mb). Rappresenta l'aa della catena a cui si **lega il gruppo eme**.

His E7 (o *distale*): -> altro aa molto importante che si trova VICINO (NON legato!) al gruppo eme (che si lega alla catena tramite His F8).

Esistono tantissime varianti anormali dell'emoglobina-> più di 300. Alcune varianti sono definite conservative altre patologiche:

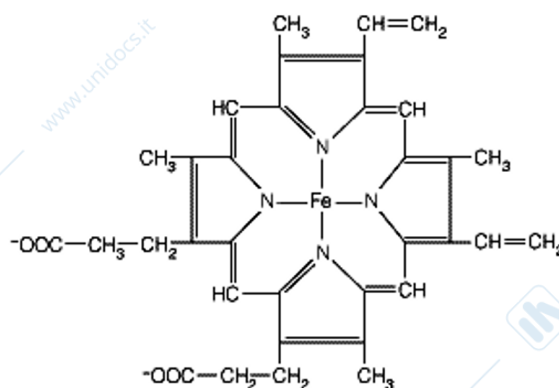
- **Conservative:** aa variato in regione ininfluente o con caratteristiche molto simili all'aa originale
- **Patologiche:** aa variato in posizione critica o aa con caratteristiche opposte rispetto a quello originale

Gruppo eme: è un **anello tetrapirrolico**. È formata da una parte organica (la protoporfirina IX) e un atomo di ferro.

All'interno dell'anello è legato lo ione Fe^{2+} che forma 6 legami: 4 con **anello porfirinico**, 1 con l'**His F8** (su un piano perpendicolare al piano dei legami con l'anello porfirinico!) e 1 con O_2 . Quindi l' O_2 lega il ferro nel gruppo eme, nell'Hb/Mb, NON alle catene aminoacidiche o globiniche. Il Fe^{2+} tenderebbe ad ossidarsi ma l'ambiente idrofobico impedisce all'ossigeno di ossidare il Fe^{2+} a Fe^{3+} .

È importante che sia Fe^{2+} perché è in grado di mantenere il corretto stato di ossidazione dell'ossigeno e perché è l'unico in grado di legarlo.

Gruppo eme: legato in maniera covalente con Mb e Hb (mioglobina ed emoglobina) tramite il legame del ferro con l'aa His F8 presente a livello della catena globinica.



Fondamentale è la presenza di **His F8**

(quello che lega il gruppo eme, che a sua volta lega O_2) e di **His E7**: la vicinanza di His E7 al gruppo eme dalla parte opposta di His F8 permette la condizione ottimale per il legame dell'ossigeno. His E7 crea ingombro sterico e fa sì che si prediliga il legame al Fe dell' O_2 piuttosto che di altre molecole.

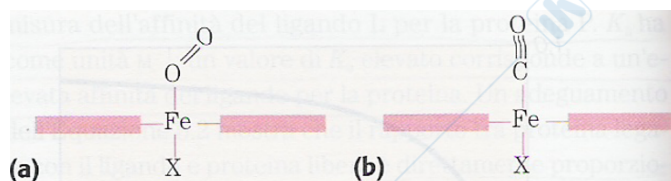
Infatti ci sono molecole che hanno un'affinità per il Fe^{2+} del gruppo eme più elevata dell' O_2 -> il **monossido di carbonio**

Il monossido di carbonio ha un'affinità molto più elevata dell'ossigeno (hence eventuali intossicazioni da CO).

Perché è importante His E7?

Permette all'ossigeno di competere con CO, in termini di affinità -> crea ingombro sterico e crea problemi per l'angolo di legame che dovrebbe formare CO con il gruppo eme. Invece non intacca minimamente l'angolo di legame dell' O_2

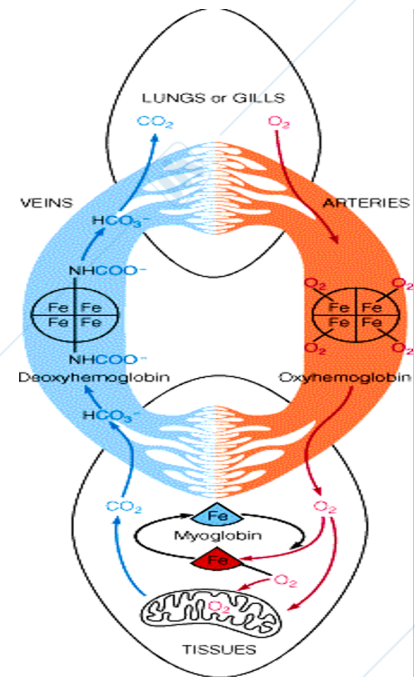
Angolo dei legami tra gruppo eme e O_2/CO



Quante molecole di ossigeno lega l'emoglobina?

Legge **4 molecole** di **ossigeno** (perché ha 4 gruppi **eme**). Una volta legato l'ossigeno, viene trasportata sotto forma di **ossiemoglobina** ai tessuti periferici -> nei tessuti periferici perderà l'ossigeno (diventa **deossiemoglobina**) e mediante il sangue venoso verrà riportata ai polmoni.

A livello muscolare è presente la **mioglobina** -> capace di legare l'ossigeno che viene rilasciato dall'emoglobina, e funge da deposito per l'ossigeno.



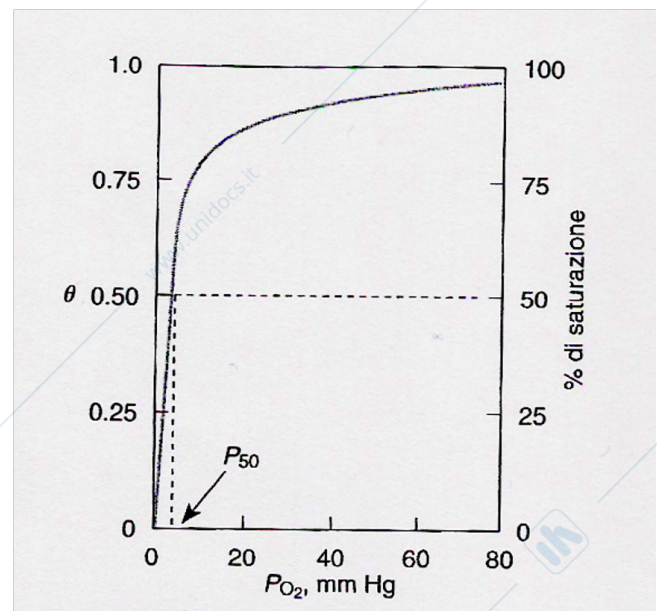
In quale modo l'emoglobina partecipa alla rimozione della CO_2 ?

CO_2 viene prodotta a livello dei tessuti periferici e deve essere rimossa.

Grafico: pressione parziale di O_2 in ascissa e percentuale di saturazione della mioglobina in ordinata -> iperbole

Basta un piccolo incremento della P parziale di O_2 (ovvero della sua []) per far si che la mioglobina legni l'ossigeno.

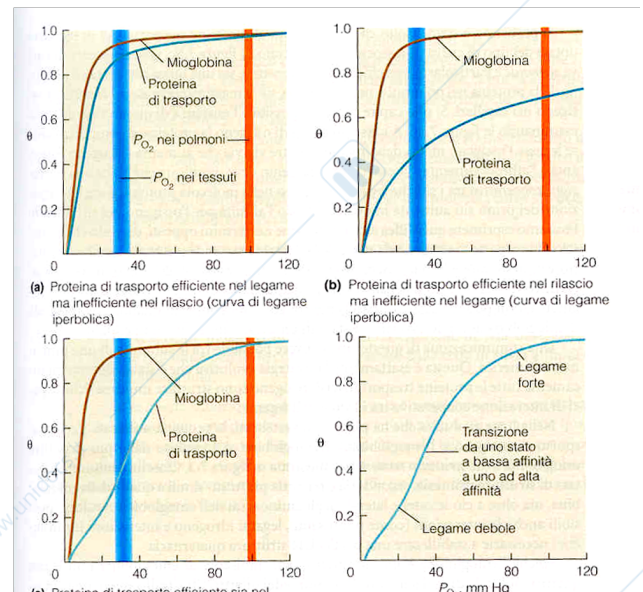
Curva di affinità dell'ossigeno per la mioglobina ----->



Curve di legame dell'ossigeno per una proteina di trasporto ----->

In queste curve analizziamo una ipotetica proteina di trasporto che lega O₂:

- Analizziamo il grafico a): ad alte pressioni parziali di ossigeno -> elevata saturazione, ma a basse pressioni parziali di ossigeno è ancora ricca di ossigeno (sbagliato! Deve rilasciarlo) -> non è efficiente nel rilasciare ossigeno
- Analizziamo il grafico b): a pressioni parziali di ossigeno basse come le abbiamo nei tessuti periferici -> la proteina è povera di ossigeno (giusto! Deve averlo rilasciato) ma ad alte pressioni parziali di ossigeno la proteina non è satura di ossigeno (sbagliato! Deve avere alta affinità e legare ossigeno) -> non è efficiente nel legare l'ossigeno
- Grafico c): proteina che ad alte pressioni parziali di ossigeno è satura e a basse pressioni parziali ha un legame debole con l'ossigeno -> perfetto! È efficiente sia nel legare ossigeno sia a rilasciarlo!

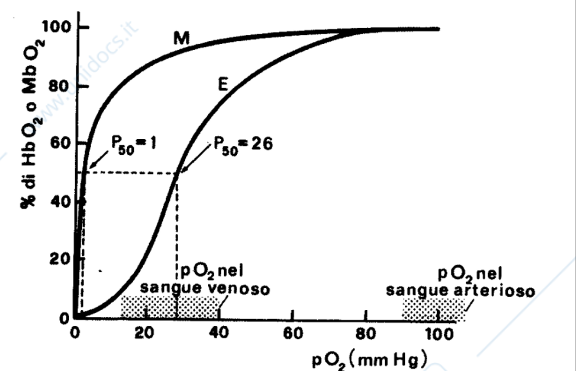


Curve di legame di O₂ per Mb e Hb:

Nei **polmoni** Hb e Mb sono **entrambe sature**. A livello polmonare, tutta la capacità dell'Hb di legare ossigeno è saturata.

Hb saturata: significa che tutti i gruppi eme dell'emoglobina saranno legati a O₂.

Nei **tessuti periferici Mb** quasi completamente **saturata** (in quelle condizioni tende a legare) invece **Hb tende a rilasciare ossigeno** (siamo nella condizione ideale per il rilascio di O₂ da parte di Hb e il legame da parte di Mb).



Come è possibile questo scambio? Due modelli:

Modello concertato: Hb esiste in uno stato conformazionale affine all'ossigeno (stato *R* o rilassato) e in uno con bassa affinità (stato *T* o teso) -> idea se c'è tanto ossigeno Hb sarà nella conformazione *R*, viceversa se è basso sarà nello stato *T*.

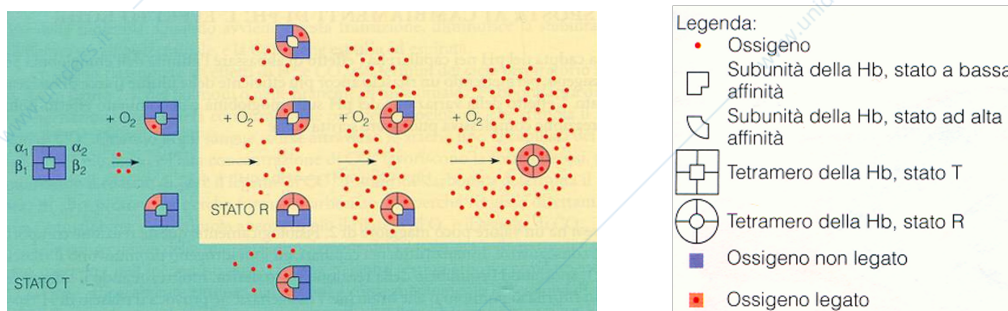
Modello concertato parzialmente superato

Modello sequenziale: considera sempre l'Hb in uno stato *R* (ad alta affinità) ed *T* (a bassa affinità).

Ipotesi: il legame dell'ossigeno ad una delle subunità dell'Hb favorisce il legame dell'O₂ alla subunità adiacente. Ad alte concentrazioni di O₂ -> praticamente tutta l'Hb è allo stato *R*.

Realtà: quando Hb non è legata all'ossigeno è in uno stato di bassa affinità definito stato *T* e l'aumentare della [O₂] fa sì che le molecole di O₂ man mano si leghino ad Hb e la subunità a cui si lega l'ossigeno cambia conformazione. È un cambiamento di conformazione delle subunità di Hb dovuto al legame della singola subunità con l'ossigeno. Questo significa che il primo legame con O₂ sia il meno sfavorito, mentre il legame della *n* molecola di ossigeno sarà più favorito.

Man mano che la concentrazione di O₂ aumenta il legame sarà facilitato (perché il primo legame di O₂ (ovvero con la prima subunità) ha influenzato tutte le altre 3 subunità di Hb).



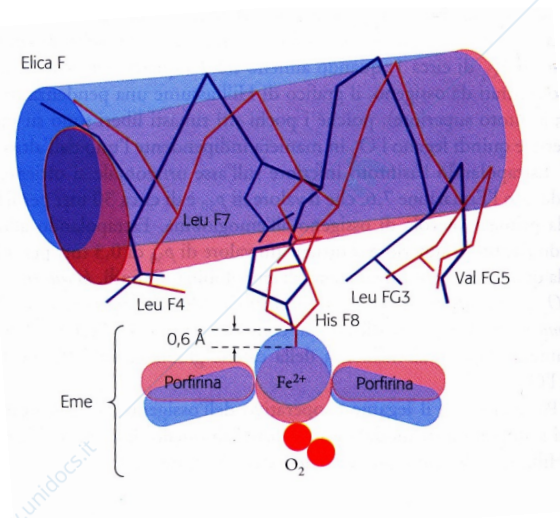
L'emoglobina esiste allo stato *T* e allo stato *R*.

Concetto importante: il cambiamento conformazionale di una subunità causa un riarrangiamento di tutta la struttura dell'Hb, influenzando la capacità delle altre subunità di legare ossigeno. **La modificazione della struttura terziaria di 1 subunità determina una modificazione della struttura quaternaria di tutta la proteina.**

Come avviene il legame O_2/Fe^{2+} ?

Ossigeno: si lega al Fe^{2+} -> diminuzione raggio atomico del ferro -> si trascina all'interno del piano dell'anello porfirinico. L'anello porfirinico si sposta e forma una struttura perfettamente planare.

Il ferro era legato con **His prossimale** (ovvero His F8) -> però il legame con O_2 fa sì che His prossimale (continua ad essere legata al ferro) venga trascinato in basso. Ma anche gli altri aa (in quanto legati a His prossimale) vengono trascinati -> tutta la sequenza aminoacidica (tutto il segmento dell' α -elica) subisce dei piccoli spostamenti -> cambiamento di tutto il segmento dell' α -elica.



Il legame dell'ossigeno determina il passaggio dell'emoglobina nello stato T (a bassa affinità) all'emoglobina nello stato R (ovvero con alta affinità) -> infatti non solo viene trascinato il ferro: viene trascinato e spostato tutto il segmento di catena globinica contenente His prossimale (quindi il legame con l'ossigeno comporta un riarrangiamento).

Cosa accade a seguito dei cambiamenti conformazionali descritti?

Cambiamento da forma deossi a ossi -> caratterizzano degli slittamenti (movimenti) a livello delle interfacce tra $\alpha 1$ e $\beta 2$ e tra $\alpha 2$ e $\beta 1$.

Prendiamo ad esempio l'aa 97:

Nello **stato T** (o forma deossi o a bassa affinità) l'aa 97 è posizionato davanti nel mezzo tra l'aa 41 e 44.

Quando si passa allo **stato R** (o forma ossi o ad alta affinità) l'aa 97 è posizionato tra il 41 e il 38 -> c'è stato uno slittamento rispetto di una catena rispetto all'altra. Ci sono movimenti di una catena rispetto all'altra ($\alpha 2$ rispetto a $\beta 1$ e $\alpha 1$ rispetto a $\beta 2$).

Paragone tra forma **deossi (T)** e **ossi (R)**:

- il legame dell'ossigeno è portato ad una rotazione delle diverse subunità dell'emoglobina

- se confrontiamo la distanza tra $\beta 1$ e $\beta 2$ nelle due conformazioni notiamo che nella **forma R la distanza tra le catene è diminuita.**
- è avvenuto uno spostamento: nella forma T, aa 97 si trova tra il 41 e il 44, mentre nella forma R lo stesso aa si trova sopra al 38 (tra 41 e 38)

Cambiamenti conformazionali che influenzano la struttura quaternaria della proteina.

Capiamo perché si parlava di due conformazioni differenti: forma T e forma R.

Quale meccanismo determina la transizione da Hb deossi e Hb ossi?

Nello **stato T**, His prossimale si trova ad un angolo di circa 8° ed è presente un aa (definito Vali FG5). Quando si lega l'ossigeno la proteina subisce un trascinarsi e ci sarà un riarrangiamento del piano del gruppo eme -> il gruppo eme diventa planare

Stato di transizione tra T e R -> legame con l'ossigeno.

L'ossigeno legato al Fe si trova in tensione rispetto al gruppo eme e l'aa Val FG5, che prima non era in tensione, ora è in tensione con il gruppo eme.

Nello **stato R**, l'aa Val FG5 subisce una rotazione -> Val FG5 e His F8 si spostano entrambi. Questo spostamento di Val FG5 elimina la tensione tra aa Val e gruppo eme (presente nello stato di transizione) e lo spostamento dell'His prossimale (o F8) elimina lo stato di tensione che His ha nei confronti del gruppo eme.

Conclusione: nuova conformazione senza le tensioni generate inizialmente dal legame con O. I cambiamenti conformazionali danno una **conformazione** di Hb **stabile**.

Ci sono fattori che influenzano il legame dell'ossigeno con Hb?

Il **pH** influenza la capacità di legame dell'ossigeno con Hb e può modificare la curva di legame dell'O₂ per Hb. Questo è anche noto come effetto Bohr.

L' effetto Bohr:

Il pH influenza l'affinità dell'Hb per l'ossigeno -> all'aumentare del pH diminuisce l'affinità dell'ossigeno per l'emoglobina. Ad un pH basso, con la stessa [O₂] avremo una minor percentuale di emoglobina satura (Hb lega meno ossigeno).

A pH elevati invece avviene il contrario.

La ΔpH è implicata quindi nei nostri scambi gassosi?

Nei tessuti periferici c'è CO₂ -> grazie all'**anidrasi carbonica** forma H₂CO₃ -> che si dissocia in (HCO₃)⁻ e ioni H⁺.

Diminuzione di pH determina uno spostamento a destra della curva sigmoide di dissociazione di Hb (ovvero la curva che descrive la presenza di stati T e stati R): ovvero a basse [O₂] aumenta la capacità di legare ossigeno (se abbasso il pH, Hb lega più facilmente l'ossigeno).

Gli ioni H⁺ che si generano dalla scissione di H₂CO₃ servono proprio per diminuire il pH e far sì che Hb perda affinità per l'ossigeno. Gli ioni NHCOO³⁻ verranno legati in parte all'emoglobina a formare la **carboemoglobina** (rilasciando inoltre altri ioni H⁺ che servono per l'affinità!).

La **CO₂** è in forma **gassosa** -> i gas non sono molto solubili nel sangue e sarebbe pericolosa: potrebbe formare delle bolle di gas. Allora CO₂ **reagisce con H₂O** in una reazione catalizzata dall'**anidrasi carbonica** e si ottiene: (HCO₃)⁻ e H⁺

Gli ioni (HCO₃)⁻ vengono rilasciati dall'eritrocita e raggiungono i polmoni e l'**anidrasi carbonica** catalizza la reazione opposta a quella che si realizza nei tessuti periferici -> torna ad essere CO₂ e può essere rimossa con l'espiazione.

Il 5% della CO₂ si trova sciolta (ma è molto poca quindi non è pericolosa) e l'85% come (HCO₃)⁻.

Altri fattori da valutare:

2,3-bisfosfoglicerato -> regola il legame dell'O₂ all'Hb.

Molecola di **2,3-bisfosfoglicerato** -sigla **BPG**- (prodotto nel nostro organismo) diminuisce l'affinità dell'ossigeno per l'emoglobina -> la curva di saturazione si sposta verso destra. Si tratta di una molecola semplice ma *come diminuisce l'affinità e quale ruolo ha fisiologicamente?*

Esempio: quando andiamo in montagna: aria più *rarefatta*, significa che c'è meno ossigeno. Non possiamo andare improvvisamente a 8 000 m -> ci mancherebbe

l'ossigeno. Ma se facciamo delle *tappe di adattamento* il nostro organismo è in grado di abituarsi: *come fa?*

Curva dell'ossigeno e dell'Hb in presenza e in funzione del **2,3-bisfosfoglicerato**: regola l'affinità di O₂ con Hb in funzione della pO₂ (pressione parziale di O₂) nei polmoni.

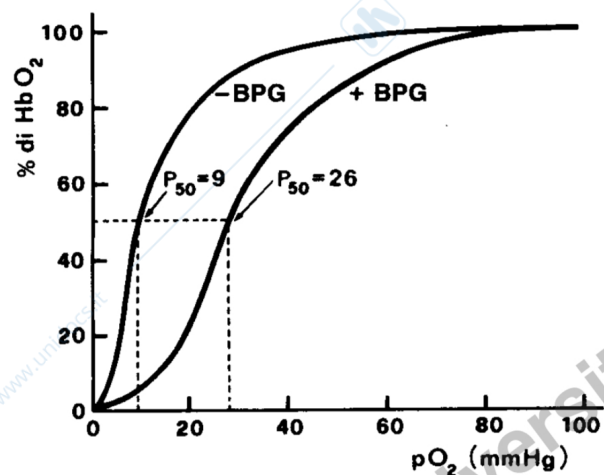
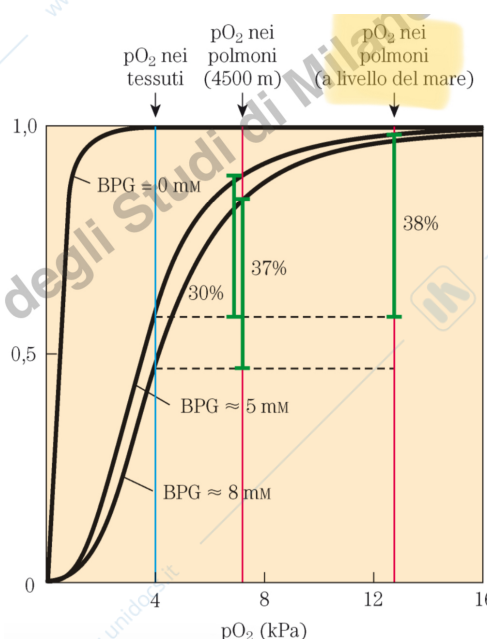


Grafico: effetto BPG sulla saturazione dell'Hb.

Normalmente un adulto sano ha 5mM di BPG a livello del mare e 8 mM di BPG in montagna.

A livello del mare circa il 40% della q. tot di ossigeno portata dal sangue è trasferito ai tessuti.

Notiamo che a basse pressioni parziali di O₂ sarà presente una concentrazione maggiore di BPG-> il corpo ne produce di più.

Se **BPG aumenta**, la **curva** si sposta **verso destra**.

Questo perché ad altitudini elevate c'è meno

ossigeno (pO₂ diminuisce) -> affinché la quantità di ossigeno rilasciata dall'Hb ai tessuti rimanga del 40% (aumento BPG in modo che l'affinità con Hb diminuisca -> + O₂ rilasciato). L'importante è che venga sempre rilasciata la stessa quantità di O₂ ai tessuti (l'effetto sui polmoni è minimo).

2,3-bisfosfoglicerato diminuisce l'affinità tra ossigeno e Hb -> permettendo un maggior rilascio di O₂ (utile se la pO₂ è bassa!!)

[Inoltre possiamo dire che: BPG stabilizza lo stato T di Hb e che l'assenza di BPG induce l'Hb nello stato R]

Il corpo per abituarsi deve aumentare la produzione di **2,3-bisfosfoglicerato**, che sposta verso destra la curva di legame dell'ossigeno per l'Hb.

Quindi il **2,3-bisfosfoglicerato** è fondamentale nel caso dell'adattamento all'altitudine ma anche al livello del mare lo abbiamo! L'altitudine aumenta semplicemente la sua [].

Funzione **2,3-bisfosfoglicerato**:

- adattamento all'altitudine
- indispensabile affinché il feto ottenga ossigeno
- SEMPRE presente in generale, non solo nelle due condizioni sopra presentate

Il feto e l'ossigeno:

Emoglobina fetale ed embrionale: sempre prodotte, prima e dopo la nascita.

Le catene gamma a seguito della nascita vengono prodotte sempre meno.

Le catene β invece inizia prima della nascita e poi aumenta in maniera esponenziale dopo la nascita.

Quale differenza c'è tra emoglobina fetale e quella adulta?

Quella fetale deve *strappare* l'ossigeno all'emoglobina della madre.

Ma perché servono le catene gamma del Hb fetale?

Perché **2,3-bisfosfoglicerato** si lega alle catene β , NON alle gamma.

Nell'emoglobina materna il **2,3-bisfosfoglicerato** si lega sulle catene β → l'ossigeno così può passare l'emoglobina materna a quella fetale. L'emoglobina fetale non viene intaccata dal **2,3-bisfosfoglicerato** perché non possiede catene β (non si può attaccare all'emoglobina fetale!) → la curva di affinità dell'ossigeno con Hb fetale non si sposterà verso destra!

Analizzare l'Hb in laboratorio:

Immaginiamo di purificare Hb e costruire la curva di legame dell'O₂ per Hb: vogliamo vedere la saturazione di Hb al variare dell'ossigeno.

Se mettiamo soltanto Hb purificata nella provetta troviamo una curva relativa alla sua saturazione.

Ma ci sono **fattori che influenzano** il legame e la saturazione di Hb: CO₂ e BPG.

- Se metto nella provetta Hb (purificata) + CO₂ + BPG -> la curva sarà la più bassa di tutte (escludendo quella del sangue intero)
- Se metto Hb (purificata) + BPG -> minore di quella con CO₂ o con solo Hb ma maggiore di Hb + CO₂ + BPG
- Se metto Hb (purificata) + CO₂ -> minore di quella con solo Hb
- Se metto sangue intero (ovvero senza mettere i singoli componenti da lab, ma prendo un campione di sangue vero) -> la curva che ottengo è quasi perfettamente sovrapponibile a quella contenente i singoli componenti selezionati (Hb, CO₂ e BPG). Questo mi fa capire che:
 - **In condizioni fisiologiche normali è sempre presente BPG** (non è una condizione esclusivamente presente in altitudine o nella donna incinta)

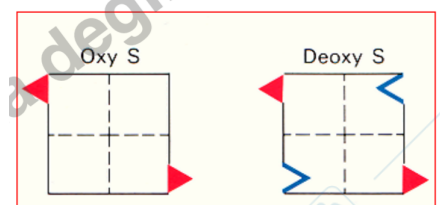
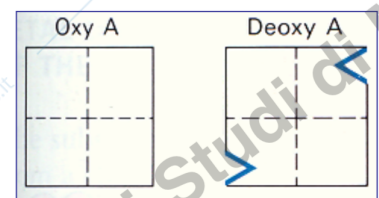
In condizioni normali fisiologiche la curva di affinità O₂/Hb è sovrapponibile alla condizione in cui aggiungiamo noi i componenti. In condizioni normali è presente anche il **2,3-bisfosfoglicerato** -> si capisce che è sempre presente!! Non solo in altitudine o in una donna incinta.



- globuli rossi soggetto normale
- globuli rossi soggetto con emoglobina S -> eritrociti con forma a falce: anemia falciforme

Anemia falciforme: cambiamento di una singola base nucleotidica che comporta l'inserimento dell'aa **Val** al posto di Glu (*acido glutammico*)

Anche nel caso dell'anemia, Hb S (Hb dell'anemia falciforme) avrà le due conformazioni oxi e deoxi: la forma deossigenata dell'Hb S forma dei filamenti -> le protrusioni rosse che la caratterizzano nella forma S si legano tra loro nelle varie Hb -> nell'anemia le molecole di Hb si legano e formano una sorta di **filamento** -> la cosiddetta *falce*



Filamento - - - - ->

